

# **Insulin derivatives, processes for their preparation, their use and pharmaceutical compositions for the treatment of diabetes mellitus**






**Patent number:** EP0132770  
**Publication date:** 1985-02-13  
**Inventor:** GRAU ULRICH DR  
**Applicant:** HOECHST AG (DE)  
**Classification:**  
- international: C07K7/40; C12P21/04; C12P21/06; A61K37/26  
- european: C07K14/62; C07K14/62A  
**Application number:** EP19840108442 19840718  
**Priority number(s):** DE19833326472 19830722

## **Also published as:**

 US4701440 (A1)  
 JP60042397 (A)  
 FI842914 (A)  
 ES8505646 (A)  
 ES8504678 (A)

more >>

## **Cited documents:**

 EP0092280  
 EP0045187  
 US4029642  
 EP0089007  
 EP0017938

Abstract not available for EP0132770

Abstract of corresponding document: **US4701440**

The invention relates to insulin derivatives of the formula I (I) in which R1 denotes H or H-Phe, R30 represents the radical of a neutral L-aminoacid and R31 represents a physiologically acceptable organic group of basic character with up to 50 carbon atoms, these derivatives having an isoelectric point between 5.8 and 8.5, processes for their preparation and their use, and agents containing these derivatives for the treatment of diabetes mellitus.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(21) Anmeldenummer: 84108442.9

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>: **C 07 K 7/40**  
**C 12 P 21/04, C 12 P 21/06**  
**A 61 K 37/26**

(22) Anmeldetag: 18.07.84

(30) Priorität: 22.07.83 DE 3326472

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
 13.02.85 Patentblatt 85/7

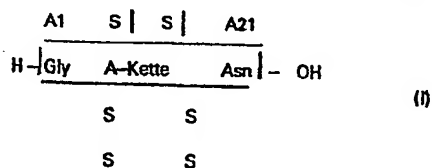
(84) Benannte Vertragsstaaten:  
 AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

(71) Anmelder: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT  
 Postfach 80 03 20  
 D-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

(72) Erfinder: Grau, Ulrich, Dr.  
 Zell 17  
 D-6238 Hofheim an Taunus(DE)

(54) Neue Insulin-Derivate, Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung sowie pharmazeutische Mittel zur Behandlung des Diabetes mellitus.

(57) Die Erfindung betrifft Insulin-Derivate der Formel I,



in welcher

R<sup>1</sup> H oder H-Phe bedeutet, R<sup>20</sup> für den Rest einer neutralen L-Aminosäure steht und R<sup>21</sup> für eine physiologisch unbedenkliche organische Gruppe basischen Charakters mit bis zu 50 C-Atomen steht, gekennzeichnet durch einen isoelektrischen Punkt zwischen 5,8 und 8,5, Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung sowie diese enthaltende Mittel zur Behandlung des Diabetes mellitus.

EP 0 132 770 A1

HOECHST AKTIENGESSELLSCHAFT HOE 83/F 141 Dr.WS/mk

Neue Insulin-Derivate, Verfahren zu deren Herstellung  
und deren Verwendung sowie pharmazeutische Mittel zur  
Behandlung des Diabetes mellitus

5 Bei der Therapie des Diabetes mellitus werden heute im  
allgemeinen Zubereitungen des blutzuckersenkenden Hormons  
Insulin parenteral verabreicht. Die spezielle Natur des  
Insulin und dessen Metabolismus bringen es mit sich, daß die  
Wirkungsdauer einer einfachen Lösung nur sehr kurz ist, daß  
10 also zur anhaltenden Blutzuckerkontrolle beim Diabetiker  
entweder eine Dauer-Infusion mit Dosiergeräten, mehrfache  
tägliche Injektionen oder eine verzögert wirksame Insulin-  
zubereitung appliziert werden müssen. Als Verzögerungsprin-  
zipien sind dabei von besonderer Bedeutung solche Zustands-  
15 formen des Insulins, die am Ort der Injektion schwerlöslich  
sind (z.B. kristallin oder amorph). Dazu zu rechnen sind  
beispielsweise Zink-Insulinkristalle oder Protamin-Insulin-  
Kristalle, die während ihrer langsamen Wiederauflösung über  
einen gewissen Zeitraum Insulin freisetzen.

20 Nun hat es sich bei der Therapie als äußerst hilfreich  
erwiesen, verschiedene Insulinpräparate zur Verfügung zu  
haben, die in ihrer Wirkungscharakteristik den Bedürfnissen  
des einzelnen Patienten möglichst nahe kommen. Im Zusammen-  
25 hang mit nicht-optimaler Einstellung werden neben unmittel-  
baren Effekten wie Hyper- oder Hypoglykämien insbesondere  
die diabetischen Spätkomplikationen diskutiert, zu denen  
Retinopathie, Neuropathie, Nephropathie, Mikro- und Makroan-  
giopathie zählen.

30 Der Insulinmangel beim Diabetiker führt dazu, daß der  
Körper sein natürliches hormonelles Gleichgewicht nicht  
mehr erreichen kann.

35

BAD ORIGINAL

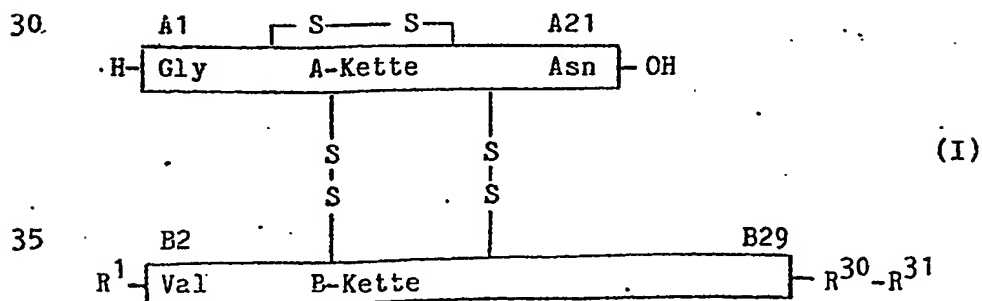
Aufgabe der Erfindung ist die Bereitstellung eines Insulin-Derivates bzw. eines entsprechenden pharmazeutischen Mittels, durch das man sich dem natürlichen hormonellen Gleichgewicht in einem diabetischen Zustand besser annähern kann und

- 5 wodurch dieses sich besser aufrechterhalten läßt als durch die Verabreichung von Insulin in den bisher üblichen Formen.

Diese Aufgabe wird nun erfindungsgemäß gelöst durch ein oder mehrere Insulin-Derivat(e), dessen (deren) B-Kette in der  
10 C-terminalen Region eine organische Gruppe basischen Charakters trägt bzw. durch ein pharmazeutisches Mittel, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es dieses Insulin-Derivat als Wirkstoff enthält.

- 15 Insulin-Derivate, die am C-terminalen Ende der B-Kette die Reste Arg-OH oder Arg-Arg-OH tragen wurden schon beschrieben. Bekanntlich entstehen diese Derivate bei der enzymatischen Umwandlung von Proinsulin in Insulin in vivo als natürliche Zwischenprodukte und sind auch in kleinen Anteilen in  
20 Pankreasextrakten nachweisbar. Die genannten Reste werden normalerweise durch Trypsin und/oder Carboxypeptidase B oder Enzyme mit ähnlicher Spezifität unter Freisetzung des nativen Insulins abgespalten.

- 25 Die Erfindung betrifft Insulin-Derivate der Formel I,



in welcher

$R^1$  H oder H-Phe bedeutet,

$R^{30}$  für den Rest einer neutralen, genetisch codierbaren L-Aminosäure steht und

- 5  $R^{31}$  für eine physiologisch unbedenkliche organische Gruppe basischen Charakters mit bis zu 50 C-Atomen steht, an deren Aufbau 0 bis 3  $\alpha$ -Aminosäuren beteiligt sind und deren gegebenenfalls vorhandene endständige Carboxyfunktion frei, als Esterfunktion, als Amidfunktion, 10 als Lacton oder zu  $CH_2OH$  reduziert vorliegen kann,

wobei, falls  $R^1$  für H-Phe steht, der C-Terminus  $-R^{30}-R^{31}$  nicht  $-\text{Thr}-(\text{Arg})_m-\text{OH}$ ,  $-\text{Ala}-(\text{Arg})_m-\text{OH}$  oder  $-\text{Ser}-(\text{Arg})_m-\text{OH}$  mit  $m=1$  oder 2 bedeuten kann,

- 15 gekennzeichnet durch einen isoelektrischen Punkt zwischen 5,8 und 8,5, sowie deren physiologisch verträglichen Salze.

Unter  $R^{31}$  wird insbesondere ein Rest der Formel  $-X_nS$  verstanden, in welcher

- 20  $n = 0, 1, 2$  oder 3 ist,

$X$  für gleiche oder verschiedene Reste natürlich vorkommender neutraler oder basischer L-Aminosäuren, vorzugsweise basischer L-Aminosäuren, insbesondere Arg, Lys His oder Orn und/oder der diesen entsprechenden 25 D-Aminosäuren steht und

$S$  OH oder eine physiologisch verträgliche, die Carboxygruppe blockierende Gruppe bedeutet, die falls  $n=0$  ist, einen positiv geladenen oder protonierbaren basischen Rest trägt oder, falls  $n>0$  ist, einen 30 solchen Rest tragen kann und worin der C-Terminus  $-X-S$  auch für den Rest einer zum entsprechenden Alkohol reduzierten Aminosäure oder, im Falle  $n=2$  oder 3, für den Homoserinlacton-Rest stehen kann.

Bevorzugt sind Insulin-Derivate der Formel I, in welcher  $R^{30}$  für den Rest einer neutralen, genetisch kodierbaren

L-Aminosäure steht,

a)  $R^1$  H bedeutet und

5  $R^{31}$  a 1) eine physiologisch verträgliche, die Carboxy-  
gruppe blockierende Gruppe  $S^B$ , die einen posi-  
tiv geladenen oder protonierbaren basischen Rest  
trägt, bedeutet,

a 2.1) für  $X^N-S^B$  steht, worin  $X^N$

10 den Rest einer natürlich vorkommenden neutralen  
L-Aminosäure oder deren D-Form bedeutet,

a 2.2) für  $X^B-S$  steht, worin  $X^B$  den Rest einer  
natürlich vorkommenden basischen L-Aminosäure  
oder deren D-Form und S OH oder eine die Carboxy-  
15 gruppe blockierende, gegebenenfalls einen  
positiv geladenen oder protonierbaren basischen  
Rest tragende Gruppe bedeuten,

a 2.3) für den Rest Y einer zum entsprechenden Alkohol  
reduzierten basischen Aminosäure  $X^B$  steht,

20

a 3.1) für  $-X_n-S$  steht, worin  $n=2$  oder 3 ist, X die  
Reste  $X^N$  und/oder  $X^B$  bedeutet und S, falls  
alle Reste  $X=X^N$  sind, nur  $S^B$  bedeuten kann,

a 3.2) für  $-X-Y$  steht, worin  $n=1$  oder 2 ist,

25 a 3.3) für  $-X^B-Z$ ,  $-X^B-X^N-Z$ ,  $-X^N-X^B-Z$  oder  
 $-X^B-X^B-Z$  steht,

worin  $Z=Y$  ist oder den Homoserinlacton-Rest  
bedeutet oder

b)  $R^1$  H-Phe bedeutet und

30

$R^{31}$

b 1) wie unter a 1) definiert ist,

b 2.1) wie unter a 2.1) definiert ist,

b 2.2) Lys-OH, D-Lys-OH, D-Arg-OH, Hyl-OH, D-Hyl-OH,  
Orn-OH, D-Orn-OH, Cit-OH, D-Cit-OH, His-OH oder  
D-His-OH bedeutet,

35 b 2.3) für  $X^B-S'$  steht, worin  $S'$  die Bedeutung von S  
mit Ausnahme der von OH hat,

- b 2.4) wie unter a 2.3) definiert ist,
- b 3.1) für  $X-X'-OH$  oder  $-X'-X-OH$  steht, worin  $X'$  wie unter b 2.2) definiert ist,

- 5    b 3.2) für  $X_2-S'$  steht,
- b 3.3) wie unter a 3.1) definiert ist, wobei  $n=3$  ist,
- b 3.4) wie unter a 3.2) oder a 3.3) definiert ist.

Insulin-Derivate, die in Position B1 Phenylalanin tragen,  
10 sind besonders bevorzugt. Weiterhin sind solche bevorzugt,  
die in der Position B30 Ala, Thr oder Ser aufweisen.

Die A-Kette und die Kette (B 2 - 29) der erfindungsgemäßen  
Verbindungen weisen zweckmäßigerweise die Sequenz des  
15 Rinder- oder Schweineinsulins, insbesondere aber die des  
Humaninsulins auf.

Die Aminosäurereste  $X$ ,  $X^N$  und  $X^B$  sowie die Reste  $Y$  und  $Z$   
können unabhängig voneinander in der D- oder L-Konfiguration  
20 vorliegen. Bevorzugt ist jedoch die L-Konfiguration all  
dieser Reste.

Genetisch kodierbar sind die folgenden L-Aminosäuren:  
Gly, Ala, Ser, Thr, Val, Leu, Ile, Asp, Asn, Glu, Gln, Cys,  
25 Met, Arg, Lys, His, Tyr, Phe, Trp, Pro (neutrale Amino-  
säuren unterstrichen).

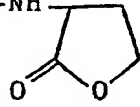
Unter einer neutralen, natürlich vorkommenden Aminosäure  
versteht man insbesondere Gly, Ala, Ser, Thr, Val, Leu, Ile,  
30 Asn, Gln, Cys, Met, Tyr, Phe, Pro oder Hyp. Unter einer  
basischen, natürlich vorkommenden Aminosäure versteht man  
insbesondere Arg, Lys, Hyl, Orn, Cit oder His.

Unter Gruppen, die gegebenenfalls eine freie Carboxyfunktion  
35 am C-terminalen Ende der B-Kette in den erfindungsgemäßen  
Verbindungen blockieren, versteht man vor allem Ester- und  
Amidgruppen, vorzugsweise ( $C_1$  bis  $C_6$ )-Alkoxy, ( $C_3$  bis

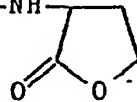
- $C_6$ )-Cycloalkyloxy,  $KH_2$ , ( $C_1$  bis  $C_6$ )-Alkylamino, Di-( $C_1$  bis  $C_6$ )-alkylamino oder basische Gruppen, wie Amino-( $C_2$  bis  $C_6$ )-alkoxy, ( $C_1$  bis  $C_4$ )-Alkylamino-( $C_2$  bis  $C_6$ )-alkoxy, Di-( $C_1$  bis  $C_4$ )-alkylamino-( $C_2$  bis  $C_6$ )-alkoxy, Tri-( $C_1$  bis  $C_4$ )-ammonio-( $C_2$  bis  $C_6$ )-alkoxy, Amino ( $C_2$  bis  $C_6$ )-alkylamino,  $\angle$  ( $C_1$  bis  $C_4$ )-Alkylamino  $\angle$ -( $C_2$  bis  $C_6$ )-alkylamino,  $\angle$  Di-( $C_1$ - $C_4$ )-alkylamino  $\angle$ -( $C_2$ - $C_6$ )-alkylamino oder  $\angle$  Tri ( $C_1$  bis  $C_4$ ) -alkylammonio  $\angle$ -( $C_2$  bis  $C_6$ )-alkylamino, insbesondere
- 10  $-O-\angle CH_2 \angle_p -NR_2$ ,  $-O-\angle CH_2 \angle_p -NR_3$ ,  $-NH-\angle CH_2 \angle_p -NR_2$  oder  $-NH-\angle CH_2 \angle_p -NR_3$ , worin  $p = 2$  bis 6 ist und R gleich oder verschieden ist und für Wasserstoff oder ( $C_1$  bis  $C_4$ )-Alkyl steht.
- 15 In der Reihe der erfindungsgemäßen Insulin-Derivate seien beispielsweise die nachstehenden Verbindungen erwähnt, ohne die Erfindung auf diese zu beschränken:
- Des-Phe<sup>B1</sup>-Schweineinsulin-Arg<sup>B31</sup>-OH
- 20 Des-Phe<sup>B1</sup>-Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-OH
- Des-Phe<sup>B1</sup>-Schweineinsulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH
- Des-Phe<sup>B1</sup>-Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH
- Schweineinsulin-Arg<sup>B31</sup>-OCH<sub>3</sub>
- Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-OCH<sub>3</sub>
- 25 Rinderinsulin-Arg<sup>B31</sup>-OCH<sub>3</sub>
- Schweineinsulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OCH<sub>3</sub>
- Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OCH<sub>3</sub>
- Des-Thr<sup>B30</sup>-Humaninsulin-Val<sup>B30</sup>-Arg<sup>B31</sup>-OH
- Des-Thr<sup>B30</sup>-Humaninsulin-Val<sup>B30</sup>-Ala<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH
- 30 Humaninsulin-Lys<sup>B31</sup>-OH
- Humaninsulin-D-Arg<sup>B31</sup>-OH
- Humaninsulin-D-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH
- Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-D-Arg<sup>B32</sup>-OH
- Humaninsulin-Lys<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH
- 35 Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-Lys<sup>B32</sup>-OH



- Humaninsulin-Argininol<sup>B31</sup>  
 Humaninsulin-Val<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH  
 Humaninsulin-Val<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-Arg<sup>B33</sup>-OH  
 Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-Argininol<sup>B32</sup>  
 5 Humaninsulin-Lys<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-Arg<sup>B33</sup>-OH  
 Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-NH-



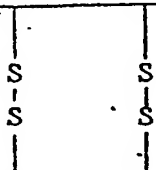
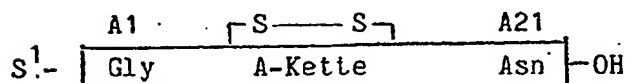
- 10 Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-NH-



- Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Humaninsulin-Orn<sup>B31</sup>-OH  
 15 Humaninsulin-Leu<sup>B31</sup>-Cit<sup>B32</sup>-OH  
 Humaninsulin-(B30)-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>  
 Humaninsulin-(B30)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>  
 Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>  
 Humaninsulin-Arg<sup>B31</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>  
 20 Humaninsulin-(B30)-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>  
 Humaninsulin-(B30)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>  
 Humaninsulin-Leu<sup>B31</sup>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sup>+</sup>(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>  
 Humaninsulin-Trp<sup>B31</sup>-Trp<sup>B32</sup>-Trp<sup>B33</sup>-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-N<sup>+</sup>[(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>3</sub>

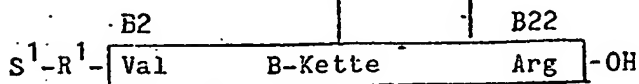
- 25 Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung von Insulin-Derivaten der Formel I das dadurch gekennzeichnet ist, daß man  
 a) ein Des-Octapeptid (B23-30)-Insulin der Formel II,

30

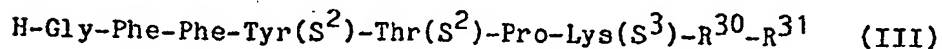


(II)

35



in der  $R^1$  Phe oder eine Bindung und  $S^1$  eine protonen-  
solvolytisch oder durch  $\beta$ -Eliminierung abspaltbare Amino-  
schutzgruppe wie den tert-Butyloxycarbonyl-(Boc), den  
tert-Amyloxycarbonyl-(Aoc) oder den Methylsulfonylethyloxy-  
5 carbonyl-(Msc)-rest bedeuten, kondensiert mit einem Peptid  
der Formel III



- 10 in welcher  $R^{30}$  und  $R^{31}$  die oben definierten Bedeutungen  
haben,  $S^2$  für Wasserstoff, Bzl oder  $\text{Bu}^t$  und  $S^3$  für  
eine Uréthanschutzgruppe, wie Boc, Moc, Fmoc oder Z stehen,  
wobei in den Resten  $R^{30}$  und  $R^{31}$  vorhandene frei  $\text{COOH-}$ ,  
 $\text{OH-}$ ,  $\text{SH-}$ ,  $\text{NH}_2\text{-}$ , Guanidino- und/oder Imidazol-Gruppen,  
15 falls erforderlich, in an sich bekannter Weise geschützt  
vorliegen, und gegebenenfalls vorhandene Schutzgruppen in an  
sich bekannter Weise abspaltet,

- b) ein Des-B30-Insulin der Formel I, in welcher  $R^1$  für H  
20 oder H-Phe und der C-Terminus  $R^{30}\text{-R}^{31}$  zusammen für OH  
stehen, in Gegenwart von Trypsin oder einer trypsinähnlichen  
Endopeptidase umgesetzt mit einer Verbindung der Formel IV



- 25 in der  $R^{30}$  und  $R^{31}$  die oben definierten Bedeutungen  
haben und worin vorhandene freie  $\text{COOH-}$ ,  $\text{OH-}$ ,  $\text{SH-}$ ,  $\omega\text{-NH}_2\text{-}$ ,  
Guanidino- und/oder Imidazol-Funktionen, falls erforder-  
lich, in an sich bekannter Weise geschützt vorliegen und  
30 anschließend gegebenenfalls vorhandene Schutzgruppen in an  
sich bekannter Weise abspaltet, oder

- c) zur Herstellung eines Insulin-Derivates mit L-konfigurierten  
Aminosäureresten in  $R^{31}$  ein Proinsulin, Proinsulinanaloges  
35 oder Präproinsulinanaloges oder ein Intermediat dieser  
Verbindungen chemisch und/oder enzymatisch spaltet.

Bei der Verfahrensvariante a) setzt man beispielsweise das  $N^{\alpha A1}, N^{\alpha B1}$ -Bis-Boc-Derivat eines Des-Octapeptid-(B23-30) Insulins analog der im US-Patent 4 029 642 beschriebenen Verfahrensweise direkt mit einem Äquivalent einer Verbindung 5 der Formel III um, wobei als Kondensationsmittel Dicyclohexylcarbodiimid im geringen Unterschuß in Anwesenheit von 1-Hydroxybenzotriazol dient.

Da bei dieser Verfahrensvariante gewöhnlich kein Schutz der 10 Carboxylgruppen erforderlich ist, entfällt normalerweise auch die Schädigung des Insulin-Derivats sowohl bei der Veresterung als auch bei der alkalischen Verseifung. Nicht umgesetztes Des-Octapeptid und ein Peptid, das durch Kondensation von IV an  $Asp^{A21}$ -OH entsteht, sind auf Grund der 15 unterschiedlichen Molekülgröße und Ladungszahl leicht durch Verteilungschromatographie an Sephadex<sup>R</sup>-LH 20 oder durch Gelchromatographie an Sephadex<sup>®</sup>-G 75 oder G 50 superfine abtrennbar.

20 Zur Abspaltung der tert-Butylschutzgruppen muß das Reaktionsprodukt nur mit Trifluoressigsäure während 30 - 60 Minuten bei Raumtemperatur behandelt werden. Diese Reaktion schädigt das Insulin-Derivat nicht. Wählt man als N-Schutzgruppe den Methylsulfonylethyl-oxy-carbonylrest, so ist zur Abspaltung 25 durch  $\beta$ -Eliminierung eine Alkalibehandlung notwendig. Die Reaktionsbedingungen sind so (z.B. 0,1 N NaOH, 0°C, 5 sek), daß das Insulin-Derivat nicht geschädigt wird. Das als Ausgangsprodukt verwendete  $N^{\alpha A1}, N^{\alpha B1}$ -Bis-Boc-Des-B<sub>23-30</sub>-Octapeptid-Insulin vom Schwein stellt man beispielsweise auf folgendem Wege her:

Schweineinsulin wird in einer Mischung aus Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid und Wasser in Anwesenheit von N-Ethylmorpholin mit überschüssigem tert.-Butyloxycarbonyl-N-hydroxy-succinimidester umgesetzt. Dabei entsteht das zu erwartende 35  $N^{\alpha A1}, N^{\alpha B1}, N^{\epsilon B29}$ -Tris-Boc-Insulin.

Man gibt nun zu der Lösung dieser Verbindung in Dimethylformamid und Tris-Puffer (pH 7,5) Trypsin in kleinen Portionen so lange zu, bis in der Elektrophorese kein Ausgangsprodukt mehr zu erkennen ist. Das N<sup>α</sup>A1,

- 5 N<sup>α</sup>B1-Bis-Boc-Des-B<sub>23-30</sub>-Octapeptid-Insulin wird durch Verteilungschromatographie an Sephadex<sup>®</sup> LH 20 gereinigt.

Diese Verbindung wird nun mit einem Mol des Peptids der Formel III, das in an sich bekannter Weise nach den Methoden  
10 der Peptidchemie hergestellt wird, 1 - 2 Mol 1-Hydroxybenzotriazol und etwa 0,9 Mol Dicyclohexylcarbodiimid in Dimethylformamid bei etwa pH 7 - 8 zur Reaktion gebracht (vgl. Chem. Ber. 103 (1970), Seite 788).

- 15 Das Rohprodukt wird durch Verteilungschromatographie gereinigt und durch Behandeln mit Trifluoressigsäure/Anisol bei Raumtemperatur von den Schutzgruppen befreit. Nach Fällung mit Ether, isoelektrischer Fällung aus Wasser und Chromatographie an Sephadex<sup>®</sup>-G 75 oder G 50 superfine ist die  
20 Verbindung elektrophoretisch rein und kann in bekannter Weise zur Kristallisation gebracht werden. Das so gewonnene Insulin-Derivat ist biologisch voll aktiv.

- Des-Phe<sup>B1</sup>-Insuline als Ausgangsverbindungen für die erfindungsgemäßen Verfahren sind beispielsweise aus der DE-PS  
25 20 05 658 oder aus der EP-A- 46 979 bekannt.

- Die bei der Verfahrensvariante b) als Ausgangsverbindungen verwendeten Des-B30-Insuline sind beispielsweise aus der  
30 EP-A-46 979 oder Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359 (1978) 799 bekannt. Das bei Variante b) verwendete Ausgangsmaterial der Formel IV wird in an sich bekannter Weise nach den Methoden der Peptidchemie hergestellt. Brauchbare Schutzgruppen für IV sind detailliert beschrieben bei M. Bodanzky  
35 et al., Peptide Synthesis, Ind. Ed. 1976, Wiley & Sons.

Das Des-B30-Insulin und die Verbindung der Formel IV werden in Analogie zu der im US-Patent 4 320 196 beschriebenen Verfahrensweise in Gegenwart von Trypsin oder einer trypsin-ähnlichen Endopeptidase in einem organisch-wässrigen Löse-  
5 mittel-System bei pH 5-9 bei und einer Temperatur von 20 bis 40°C miteinander kondensiert. Das erhaltene Insulin-Derivat kann nach den gebräuchlichen Methoden der Peptidchemie isoliert werden.

10 Durch gentechnologische Methoden ist inzwischen humanes oder Primaten-Proinsulin als Ausgangsmaterial für die Verfahrensvariante c) zugänglich. Die Derivate Arg(B31) und Di-Arg(B31-32) sind daraus durch einfache Verdauung mit Trypsin oder trypsin-ähnlichen Enzymen zugänglich. Daneben  
15 lassen sich aber auch relativ einfach Plasmide konstruieren, die durch Spaltung entsprechender Präproinsulinderivate zu neuen Insulinderivaten führen, weil sie an Stelle der natürlich an B31 oder B32 befindlichen Arginine für andere neutrale oder basische Aminosäuren codieren.

20

Die Herstellung von Proinsulin unter Anwendung der Rekombinations-DNA-Methodologie erfordert die Bildung einer DNA-Sequenz, die für die Aminosäuresequenz eines Proinsulins codiert, was sich entweder durch Isolierung, Konstruktion  
25 oder eine Kombination aus beidem erreichen läßt. Die Proinsulin-DNA wird dann in Lese-Phase in einen geeigneten Clonierungs- und Expressionsträger eingesetzt. Der Träger dient zur Transformierung eines geeigneten Mikroorganismus, und der hierbei erhaltene transformierte Mikroorganismus  
30 wird dann Fermentationsbedingungen unterzogen, die zur Bildung weiterer Kopien des proinsulingehaltigen Vektors und zur Expression von Proinsulin, eines Proinsulinderivats oder eines Proinsulinvorläufers (bzw. eines Präproinsulinderivats) führen.

35

Handelt es sich beim Expressionsprodukt um einen Proinsulinvorläufer, dann enthält ein solches Produkt im allgemeinen

die Proinsulinamino-säuresequenz, die an ihrer endständigen Aminogruppe an ein Bruchstück eines Proteins gebunden ist, das normalerweise durch die Gensequenz ausgedrückt wird, in welcher das Proinsulin oder Proinsulinderivat eingesetzt worden ist. Die Proinsulinamino-säuresequenz ist an das Proteinbruchstück über eine spezifisch spaltbare Stelle gebunden, bei der es sich beispielsweise um Methionin handelt. Die erhaltene Proinsulinamino-säuresequenz wird vom verschmolzenen Genprodukt, beispielsweise wie in der DE-A-32 32 036 beschrieben, abgespalten und das Proinsulin nach Reinigung isoliert.

Die enzymatische Spaltung des auf diese Weise erhaltenen Proinsulins oder Proinsulinderivats erfolgt in Analogie zu der in Excerpta Medica International Congress Series No. 231, Seite 292 ff. oder der in der deutschen Patentanmeldung P 32 09 184 (HOE 82/F 047) beschriebenen Verfahrensweise.

Mit Hilfe der beschriebenen semisynthetischen Verfahren sind zusätzlich zu den bekannten Arginin (B30)- und Diarginin (B31-32)-Derivaten sowie jenen durch gentechnologische Methoden zugänglichen Derivaten, die in R<sup>31</sup> natürliche L-Aminosäuren tragen, eine Reihe von neuen Insulin-Derivaten zugänglich, die als Charakteristikum eine oder mehrere basische Gruppe und/oder die Abwesenheit der freien Carboxylgruppe aufweisen, so daß die Nettoladung des Moleküls um mindestens eine positive Ladung gegenüber nativem Insulin oder gegenüber Des-Phe<sup>B1</sup>-Insulin zunimmt.

Dazu gehören z.B. Derivate, die an Position B31 statt der natürlichen Aminosäuren L-Lysin, L-Histidin oder L-Arginin deren D-Enantiomere oder gängige D- oder L-Aminosäureanaloge, die in der Seitenkette eine basische Gruppierung (z.B. Ornithin, Hydroxylysin tragen, aufweisen. Statt einer Aminosäure kann an Stelle der Position B31 beispielsweise die Cholinestergruppe treten, wodurch netto zwei Positivladungen gewonnen werden. Die Aminosäure oder das Aminosäureanalogon an Position B31

kann ein freies Carboxylende aufweisen oder mit einfachen Alkoholen (z.B. Methanol, Ethanol) verestert bzw. mit einfachen Stickstoffbasen (z.B. Ammoniak, mono-, di- Methylamin) amidiert sein; sie kann daneben z.B. mit Cholin verestert  
5 sein. An Position B32 kann beispielsweise eine neutrale oder auch eine weitere natürliche basische Aminosäure oder eines der oben beschriebenen Aminosäurederivate folgen; in analoger Weise kann deren Carboxylgruppe frei oder verestert bzw. amidiert sein. Es kann beispielsweise auch hier die Cholin-  
10 estergruppe bzw. noch eine weitere neutrale oder basische Aminosäure bzw. ein Aminosäureanalogon folgen.

Allen diesen Insulinderivaten ist gemeinsam, daß die zusätzliche(n), an der Oberfläche des Moleküls befindliche(n)  
15 positive(n) Ladung(en) dem Molekül einen in den Neutralbereich hinein verschobenen isoelektrischen Punkt verleihen. Je nach Derivat werden isoelektrische Punkte von 5,8 bis 8,5, insbesondere 6,2 bis 8,2 in der isoelektrischen Fokussierung gemessen. Damit sind die Derivate im Neutral-  
20 bereich weniger löslich als natives Insulin oder Proinsulin, die ihren isoelektrischen Punkt und damit den Bereich maximaler Unlöslichkeit bei pH=5,4 haben, während sie im Neutralbereich normalerweise gelöst vorliegen.

25 Die Löslichkeitseigenschaften von Insulin und Proinsulin lassen sich im Bereich oberhalb des isoelektrischen Punktes, d.h. im therapeutisch besonders interessanten Neutralbereich, durch Zugabe von Zinkionen beeinflussen. Zink wirkt dabei als Depotprinzip in der Weise, daß es den hexameren Zustand  
30 des Insulins sowie dessen Kristallisierungstendenz stabilisiert. Im subkutanen Gewebe lösen sich diese Aggregate wieder.

Ein weiteres geläufiges Depotprinzip ist die Kristallisation  
35 des Insulins oder Proinsulins als Komplex mit einem basischen Protein, z.B. Globin oder Protamin.

Bei der Anwendung des Proinsulins in Lösung oder in Verbindung mit einem der beschriebenen Depotprinzipien bedarf es eines weiteren proteolytischen Abbaus, um natives, voll wirksames Insulin freizusetzen. Intaktes Proinsulin hat nur  
5 etwa 1/8 der biologischen Wirksamkeit des Insulins, weil, so die Vorstellung, ein Teil der biologisch aktiven Oberflächenregion, die Rezeptor-Bindungsregion, durch das im Proinsulin vorhandene C-Peptid maskiert ist. Als Proinsulin kommt allerdings für die Diabetestherapie nur homologes,  
10 also nur solches mit menschlicher Sequenz, in Frage (vgl. z.B. DE-A1-32 32 036). Heterologes Proinsulin besitzt eine signifikante Immunogenität. Es ist in diesem Zusammenhang bemerkenswert, daß auch humane Proinsuline Variationen im C-Peptidteil aufweisen können.

15 Schweineinsulin-Arg<sup>B31</sup>OH und das entsprechende Diargininderivat weisen den Untersuchungen von Chance, Excerpta Medica International Congress Series No. 231, Seite 292, 293 zufolge nur 62 % bzw. 66 % der Aktivität des nativen Schweineinsulins auf.  
20

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß Insulin-Arg<sup>B31</sup>-OH, Insulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH und andere Insulin-Derivate, deren B-Kette C-terminal eine organische Gruppe  
25 basischen Charakters trägt, im Unterschied zum Proinsulin eine etwa gleich hohe biologische Aktivität wie natives Insulin aufweisen.

Die Erfindung betrifft daher Arzneimittel zur Behandlung des  
30 Diabetes mellitus aus einem pharmazeutisch unbedenklichen Träger und einem Wirkstoff, dadurch gekennzeichnet, daß es als Wirkstoff ein Insulin-Derivat mit einem isoelektrischen Punkt zwischen 5,8 und 8,5 und der Formel I, in welcher  
R<sup>1</sup> H oder H-Phe bedeutet,

35



- R<sup>30</sup> für den Rest einer neutralen, genetisch kodierbaren L-Aminosäure steht und
- R<sup>31</sup> für eine physiologisch unbedenkliche organische Gruppe basischen Charakters mit bis zu 50 C-Atomen steht, an deren Aufbau 0 bis 3  $\alpha$ -Aminosäuren beteiligt sind und deren gegebenenfalls vorhandene endständige Carboxyfunktion frei, als Esterfunktion, als Amidfunktion, als Lacton oder zu CH<sub>2</sub>OH reduziert vorliegen kann, oder eines seiner physiologisch verträglichen Salze enthält.

Die erfindungsgemäßen Arzneimittel stellen weiterhin vollkommen neue Verzögerungsprinzipien dar, die ohne Depot-Hilfsstoffe, wie Zink oder Protaminsulfat, zur Wirkung gebracht werden können. Die Depotwirkung geht auf ein inhärentes, proteinchemisch bedingtes, physikalisches Prinzip, die Schwerlöslichkeit des Insulin-Derivats an dessen isoelektrischem Punkt, zurück. Seine Wiederauflösung unter physiologischen Bedingungen wird möglicherweise durch Abspaltung der zusätzlichen basischen Gruppen erreicht, die je nach Derivat durch tryptische oder trypsinähnliche und/oder Carboxypeptidase B oder der Carboxypeptidase B ähnliche und/oder Esterase-Aktivität zustande kommt. Die jeweils abgespaltenen Gruppen sind entweder rein physiologische Metaboliten, wie Aminosäuren, Ornithin oder Cholin, oder aber leicht metabolisierbare, physiologisch unbedenkliche Substanzen.

Die Insulin-Derivate als Wirkstoffe dieser neuen Arzneimittel sind auch im Unterschied zu in der Literatur beschriebenen Intermediaten, die noch Teile des heterologen C-Peptids enthalten, nicht stärker immunogen als das entsprechende Insulin selbst.

Die obengenannten zu niedrigen Aktivitätswerte von Chance haben möglicherweise ihre Ursache in einer ungenügenden

Reinheit der untersuchten Fraktionen oder in einem systematischen Meßfehler. Ihre Verwendbarkeit als Arzneimittelnwirkstoffe wurden jedenfalls bisher (und vielleicht daher) noch nicht erkannt.

5

Die erfindungsgemäßen Mittel enthalten als Wirkstoff eines oder mehrere der neuen Insulin-Derivate der Formel I oder Insulin-Arg<sup>B31</sup>-OH oder Insulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH.

10 Sie weisen vorzugsweise einen pH-Wert zwischen 2,5 und 8,5 auf, enthalten ein geeignetes Isotoniemittel, ein geeignetes Konservierungsmittel und gegebenenfalls einen geeigneten Puffer für einen pH-Bereich zwischen 5,0 und 8,5.

15 Eine typische Anwendungsform der beschriebenen Derivate stellen Präparationen dar, die unterhalb des isoelektrischen Punktes als Lösungen in einem physiologisch unbedenklichen Träger vorliegen. Dabei kann der pH der Lösung typischerweise pH=5,0 betragen, liegt also deutlich höher als der von sauren Altinsulinen (typischerweise pH=3,0). Eine neutralere  
20 Injektionslösung bietet u.U. deutliche Vorteile in Bezug auf deren Verträglichkeit.

Eine weitere typische Anwendungsform sind Suspensionen aus  
25 amorphen oder kristallinen Niederschlägen der beschriebenen Derivate in einem physiologisch unbedenklichen Träger von etwa neutralem pH.

Es ist aber auch möglich, die in den Derivaten inhärente  
30 Schwerlöslichkeit im physiologischen pH-Bereich durch zusätzliche Depotprinzipien, wie etwa durch Zugabe von Zink oder Protaminsulfat, zu verstärken. Die zugesetzte Zinkmenge kann dabei bis zu 100 µg Zn<sup>2+</sup>/100 Insulineinheiten, typischerweise etwa 50 µg Zn<sup>2+</sup>/100 Insulineinheiten,  
35 betragen. Die Protaminmenge kann zwischen 0,28 mg und 0,6 mg

pro 100 Einheiten betragen (bezogen auf Protaminsulfat). Auf diese Weise sind besonders lang wirksame Präparationen herstellbar für die es in Zukunft breitere Anwendung als bisher geben wird, nachdem gerade eine Basalmenge an Insulin  
5 therapeutisch vorteilhaft erscheint. Dies ist schon jetzt eine Erkenntnis aus der Therapie mit Insulindosiergeräten.

Als physiologisch unbedenkliches und mit dem Insulinderivat verträgliches Trägermedium eignet sich eine sterile wäßrige  
10 Lösung, die zu Blut in der üblichen Weise, z.B. durch Glycerin, Kochsalz, Glucose, isotonisch gemacht wird und daneben noch eines der gebräuchlichen Konservierungsmittel z.B. Phenol, m-Kresol oder p-Hydroxybenzoesäureester, enthält. Das Trägermedium kann zusätzlich eine Puffer-  
15 substanz, z.B. Natriumacetat, Natriumcitrat, Natriumphosphat, enthalten. Zur Einstellung des pH werden verdünnte Säuren (typischerweise HCl) bzw. Laugen (typischerweise NaOH) verwendet.

20 Die Insulin-Derivate können in den erfindungsgemäßen Mitteln auch als Alkali- oder als Ammoniumsalze eingesetzt werden. Ein beliebiger Anteil eines oder mehrerer Insulin-Derivate der Formel I oder ein Insulin-Derivat der Formel I kann in einer Mischung weiterer dieser Insulin-Derivate unabhängig vonein-  
25 ander jeweils in gelöster, amorpher und/oder kristalliner Form vorliegen.

Es ist manchmal vorteilhaft, der erfindungsgemäßen Zubereitung eine geeignete Menge eines geeigneten Stabilisators zuzusetzen, der die Präzipitation von Protein bei thermisch-  
30 mechanischer Belastung bei Kontakt mit verschiedenen Materialien verhindert. Solche Stabilisatoren sind beispielsweise aus der EP-A-18609, der DE-A-32 40 177 oder aus der WO-83/00288 bekannt.

Zu den erfindungsgemäßen Mitteln, die auch eines der bekannten Verzögerungsprinzipien, wie etwa Protaminsulfat, Globin oder Zink in geeigneten Mengen enthalten können, kann ein solches Verzögerungsprinzip in Kombination mit dem gesamten Wirkstoffanteil oder mit Teilen davon oder einem oder mehreren Insulin-Derivaten der Formel I in einer Mischung angewandt werden. Ein Mittel kann verschiedene Insulin-Derivate der Formel I in Kombination mit mehreren verschiedenen verzögernd wirkenden Hilfsstoffen enthalten.

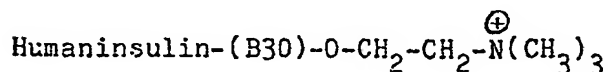
10

Mit den erfindungsgemäßen therapeutischen Mitteln sind also offenkundig vielfältige und sehr fein abstimmbare Wirkungscharakteristiken erzielbar; damit sollten nach den eingangsgemachten Bemerkungen Fortschritte insbesondere im Hinblick auf diabetische Spätkomplikationen verbunden sein.

15

Zur weiteren Erläuterung der Erfindung sollen die folgenden Beispiele dienen:

20 Herstellungsbeispiel 1:



5 g Schweineinsulin werden in 45 ml Dimethylformamid, 25 ml Dimethylsulfoxid, 0,5 ml N-Ethylmorpholin und 2,5 ml Wasser gelöst. Unter Rühren gibt man bei Raumtemperatur 1,5 g tert-Butyloxycarbonyl-N-hydroxysuccinimid zu und läßt 6 Stunden reagieren. Dann wird durch Zugabe eines Tropfens Eisessig gestoppt, das Produkt mit Ether gefällt und abfiltriert. Der Rückstand wird in 360 ml Dimethylformamid gelöst und mit 320 ml Tris-Puffer (0,05 M, 0,01 M an  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,5) verdünnt. Bei 36°C werden im Abstand von je 1 Stunde Portionen von 20 mg Trypsin zugegeben.

30

35 Nach insgesamt 12 Zugaben stellt man mit Essigsäure auf pH 4,5 und dampft die Lösung ein. Die anschließende Reinigung des Materials an einer Sephadex<sup>®</sup>-LH 20-Säule (8 x 200 cm)

nittels Verteilungschromatographie im System n-Butanol-Eis-  
essig-Wasser (2:1:10) ergibt 3,25 g  $N^{\alpha A1}$ ,  $N^{\alpha B1}$ -

Bis-Boc-Des-B<sub>23-30</sub>-Octapeptid-Insulin (Schwein), das in  
der sauren und basischen Elektrophorese kein Ausgangsmate-  
5 rial mehr zeigt. Die Aminosäureanalyse der Substanz ist  
korrekt. Nach einer probeweisen Abspaltung der HOE-Gruppen  
ist keine Insulinaktivität mehr zu finden. Dieses Material  
(3,25 g) wird in 30 ml Dimethylformamid zusammen mit 100 mg  
1-Hydroxybenzotriazol, 750 mg  $HCl \cdot Gly-Phe-Phe-Tyr(Bu^t)-Thr-$   
10  $Pro-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-OCH_2CH_2-N(CH_3)_3^+HCl$  und 0,5 ml  
N-Ethylmorpholin gelöst. Dann gibt man bei Raumtemperatur  
120 mg Dicyclohexylcarbodiimid zu und rührt die Reaktion  
24 Stunden. Der abgeschiedene Dicyclohexylharnstoff wird  
abfiltriert, das Produkt durch Etherzugabe gefällt.

15 Den Niederschlag filtriert man ab, wäscht mit Ether und  
trocknet. Die Substanz wird durch Verteilungschromatographie  
an Sephadex<sup>®</sup>-LH 20 im obigen System vorgereinigt. 2,6 g.  
Material aus dem Hauptpeak isoliert man durch Fällung mit  
20 Aceton/Ether. Das getrocknete, noch ungeschützte Derivat  
läßt man mit einem Gemisch aus 5 ml Trifluoressigsäure  
und 1 ml Anisol 60 Minuten bei Raumtemperatur reagieren.  
Aus der mit Eis gekühlten Lösung fällt man anschließend  
die Rohsubstanz durch Zugabe von Ether. Den getrockneten  
25 Niederschlag löst man in Wasser, präzipitiert mit wäßrigem  
Ammoniak und zentrifugiert. Die Reinigung des Produktes  
erfolgt in 10%iger Essigsäure über Sephadex<sup>R</sup>-G 50 super-  
fine oder G 75. Aus den Fraktionen des gewünschten Peaks  
kann man das Humaninsulin-(B3C)- $OCH_2CH_2N(CH_3)_3^+$   
30 durch Gefriertrocknung isolieren (Ausbeute nach Kristalli-  
sation: 1,2 g). Das so gewonnene Insulin-Derivat zeigt im  
biologischen Test eine dem Humaninsulin äquivalente Wirk-  
samkeit.

35 Die Herstellung des Oktapeptids der Formel III erfolgt gemäß  
folgendem Kondensationsschema nach üblichen Peptid-Konden-  
sationsmethoden:

## Syntheschema für das Octapeptid der Formel III

Gly	Phe	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Thr
	Z-OH	H-OBu <sup>t</sup>					
	DCC/HOBt						
	Z	OBu <sup>t</sup>					
	H <sub>2</sub> /Pd		Bu <sup>t</sup>			BOC	Bu <sup>t</sup>
Z-OH	H	OBu <sup>t</sup>	Z-OH	H-OMe		Z-OH	H-OCholin
DCC/HOBt			DCC/HOBt			DCC/HOBt	
Z		OBu <sup>t</sup>	Bu <sup>t</sup>	OMe		BOC	Bu <sup>t</sup>
			Z			Z	OCholin
	TFE		H <sub>2</sub> /Pd			H <sub>2</sub> /Pd	Bu <sup>t</sup>
Z		OH	Bu <sup>t</sup>	OMe	Z-OH	BOC	OCholin
		DCC/HOBt	H		DCC/HOBt	H	
Z			Bu <sup>t</sup>	OMe	Z	BOC	Bu <sup>t</sup>
							OCholin
Z			NaOH			H <sub>2</sub> /Pd	Bu <sup>t</sup>
			Bu <sup>t</sup>	OH		BOC	OCholin
Z				H			
			Bu <sup>t</sup>	DCC/HOBt			
Z						BOC	Bu <sup>t</sup>
							OCholin
			H <sub>2</sub> /Pd			BOC	Bu <sup>t</sup>
H			Bu <sup>t</sup>				OCholin

Aminosäure- und Elementaranalyse entsprechen der Theorie

Herstellungsbeispiel 2:

Schweineinsulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH durch tryptische Verdauung aus Schweineproinsulin

5

350 mg Schweineproinsulin werden in 25 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH=7,5 gelöst. Zu dieser Lösung werden bei Raumtemperatur 500 µg Trypsin zugesetzt, wobei innerhalb weniger Stunden eine Trübung auftritt. Nach vollendeter

- 10 Reaktion wird abzentrifugiert, der Niederschlag sauer gelöst und mit Hilfe von Acetatfolienelektrophorese oder HPLC analysiert. Nach erneuter Ausfällung und Waschen des Niederschlages wird dieser in an sich bekannter Weise aufgearbeitet oder er wird an einem Kationenaustauscher mit
- 15 0,05 M Acetat, pH=4,0, mit einem Kochsalzgradienten bis 0,5 M gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen werden vereinigt und ausgefällt. Nach Waschen und Umkristallisation werden 104 mg nach Aminosäureanalyse identifiziertes und nach HPLC und isoelektrischer Fokussierung als
- 20 einheitlich charakterisiertes Schweineinsulin-Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH isoliert.

In analoger Weise wird aus dem entsprechenden, in Position B31 modifizierten Schweineproinsulin das Insulin-Derivat

- 25 Schweineinsulin-Lys<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup>-OH erhalten.

Beispiel 1:

- 5 Insulin-Arg. B<sup>31</sup>-Arg B<sup>32</sup>-OH vom Schwein (hergestellt durch tryptische Verdauung aus Proinsulin vom Schwein) in schwach saurer, gelöster Formulierung mit 40 I.E. pro ml und deren Depot-Wirksamkeit:

- 10 Man löst in einem Gesamtvolumen von 10 ml Wasser

Insulin-Arg B <sup>31</sup> -Arg B <sup>32</sup> -OH vom Schwein	14,8 mg
(27 I.E./mg)	
Traubenzucker (Monohydrat) krist.	540,0 mg
p-Hydroxybenzoesäuremethylester	10,0 mg

- 15 Der pH-Wert wird durch Zugabe von 1 N HCl bzw. 1 N NaOH auf pH = 4,5 eingestellt.  
Eine solche Lösung zeigt bei einer Dosierung von 0,4 I.E./kg am Kaninchen eine ausgeprägte Depot-Wirksamkeit. Die Fläche
- 20 unter der Blutzuckerkurve ist gleich wie die eines Standardpräparates mit 40 I.E./ml.

Beispiel 2:

- 25 Humaninsulin-(B<sup>30</sup>)-Cholinester, hergestellt durch Semi-synthese aus Schweineinsulin, in neutraler Formulierung mit 40 I.E. pro ml und deren Depot-Wirksamkeit:

Man löst in einem Gesamtvolumen von 10 ml Wasser

- 30
- |   |          |
|---|----------|
| Humaninsulin-(B <sup>30</sup> )-Cholinester | 14,3 mg  |
| (28 I.E./mg)                                |          |
| Natriumdihydrogenphosphat-dihydrat          | 21,0 mg  |
| m-Kresol                                    | 27,0 mg  |
| 35 Glycerin                                 | 160,0 mg |

Der pH-Wert wird durch Zugabe von 1N HCl bzw. 1 N NaOH auf pH = 7,3 eingestellt.

Eine solche Suspension zeigt bei einer Dosierung von 0,4 I.E./kg am Kaninchen eine ausgeprägte Depot-Wirksamkeit.



Beispiel 3:

Humaninsulin-Arg-B<sup>31</sup>-OH hergestellt aus Schweineinsulin durch Semisynthese, in Form einer kristallinen NPH-Zubereitung mit 40 I.E./ml und deren stark verzögerte Wirkung:

Man löst in einem Gesamt-Volumen von 10 ml mit Wasser:

Humaninsulin-Arg-B <sup>31</sup> -OH	14,5 mg
10 (27,5 I.E./mg)	
Protaminsulfat	1,3 mg
Natriumdihydrogenphosphat-dihydrat	21,0 mg
m-Kresol	15,0 mg
Phenol	6,0 mg
15 Glycerin	160,0 mg

Der pH-Wert wird durch Zugabe von 1 N HCl bzw. 1 N NaOH auf pH = 7,3 eingestellt.

20 Eine solche Kristallsuspension zeigt bei einer Dosierung von 0,4 I.E./kg am Kaninchen eine stark verzögerte Wirkung.

Beispiel 4:

25 Mischung von Humaninsulin-Arg-B<sup>31</sup>-OH und Humaninsulin-Arg-B<sup>31</sup>-Arg-B<sup>32</sup>-OH, beide hergestellt durch Semisynthese aus Schweineinsulin, in Form einer zinkhaltigen Suspension mit 40 I.E./ml und deren stark verzögerte Wirkung:

30 Man löst in einem Gesamt-Volumen von 10 ml mit Wasser:

Humaninsulin-Arg-B <sup>31</sup> -OH	
(27,5 I.E./mg)	7,3 mg
Humaninsulin-Arg-B <sup>31</sup> -Arg-B <sup>32</sup> -OH	
35 (27,0 I.E./mg)	7,4 mg

Zinkchlorid, wasserfrei	0,46 mg
Natriumacetat	14,0 mg
p-Hydroxybenzoesäuremethylester	10,0 mg
Kochsalz	80,0 mg

5

Der pH-Wert wird durch Zugabe von 1 N HCl bzw. 1 N NaOH auf pH = 7,0 eingestellt.

Eine solche Suspension zeigt bei einer Dosierung von 0,4 I.E./kg am Kaninchen eine stark verzögerte Wirkung.

Beispiel 5:

Humaninsulin-Arg-B<sup>31</sup>-Lys-B<sup>32</sup>-OCH<sub>3</sub> hergestellt durch  
 15 Semisynthese aus Schweineinsulin, in Form einer schwach sauren, gelösten Zubereitung mit 100 I.E./ml und deren verzögerte Wirkung:

Man löst in einem Gesamt-Volumen von 10 ml mit Wasser:

20

Humaninsulin-Arg-B <sup>31</sup> -Lys-B <sup>32</sup> -OCH <sub>3</sub> (27,0 I.E./mg)	37,0 mg
Natriumacetat	14,0 mg
p-Hydroxybenzoesäuremethylester	10,0 mg
25 Kochsalz	80,0 mg

Durch Zugabe von 1 N HCl bzw. 1 N NaOH wird pH = 6,0 eingestellt.

30 Eine solche Lösung zeigt am Kaninchen eine verzögerte Wirkung.

Beispiel 6:

- Humaninsulin-Arg-B<sup>31</sup>-OH, hergestellt durch tryptische  
Spaltung aus Primaten-Präproinsulin bakteriellen Ursprungs,  
5 in Form von NPH-Kristallen, in Mischung mit Humaninsulin-  
Arg-B<sup>31</sup>-Arg-B<sup>32</sup>-OH, hergestellt durch tryptische Spaltung  
aus Primaten-Präproinsulin bakteriellen Ursprungs:

Man löst in einem Gesamt-Volumen von 10 ml mit Wasser:

10

Humaninsulin-Arg-B <sup>31</sup> -OH	
(27,5 I.E./mg)	11,1 mg
Humaninsulin-Arg-B <sup>31</sup> -Arg-B <sup>32</sup> -OH	
(27,0 I.E./mg)	3,7 mg
15 Protaminsulfat	1,0 mg
Natriumdihydrogensulfat-2-Hydrat	21,0 mg
m-Cresol	15,0 mg
Phenol	6,0 mg
Glycerin	160,0 mg

20

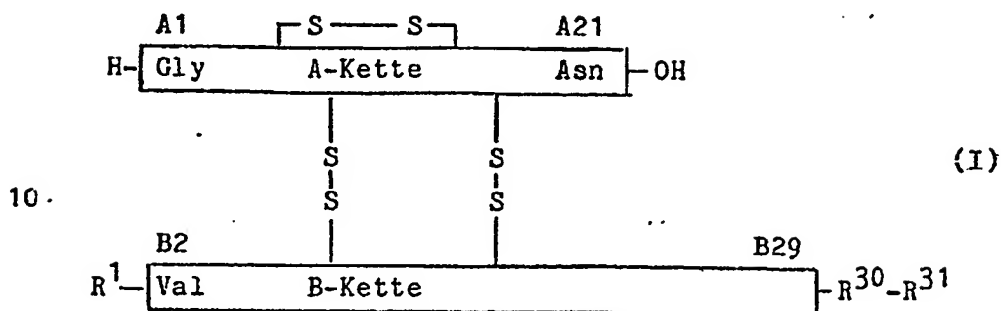
Der pH wird durch Zugabe von 1 N NaOH bzw. 1 N HCl auf  
pH = 7,2 eingestellt.

- Diese Suspension zeigt am Kaninchen (0,4 I.E./kg) eine stark  
25 verzögerte Wirkung.

Patentansprüche:

1. Insulin-Derivat der Formel I,

5



in welcher

15  $R^1$  H oder H-Phe bedeutet,  
 $R^{30}$  für den Rest einer neutralen, genetisch kodierbaren L-Aminosäure steht und  
 $R^{31}$  für eine physiologisch unbedenkliche organische Gruppe basischen Charakters mit bis zu 50 C-Atomen steht, an deren Aufbau 0 bis 3  $\alpha$ -Aminosäuren beteiligt sind und deren gegebenenfalls vorhandene endständige Carboxy-  
 20 funktion frei, als Esterfunktion, als Amidfunktion, als Lacton oder zu  $CH_2OH$  reduziert vorliegen kann, wobei, falls  $R^1$  für H-Phe steht, der C-Terminus  $-R^{30}-R^{31}$   
 25 nicht -Thr-(Arg)<sub>m</sub>-OH, -Ala-(Arg)<sub>m</sub>-OH oder -Ser-(Arg)<sub>m</sub>-OH mit m=1 oder 2 bedeuten kann, gekennzeichnet durch einen isoelektrischen Punkt zwischen 5,8 und 8,5, oder dessen physiologisch verträglichen Salze.

30 2. Insulin-Derivat der Formel I gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß

$R^{31}$  für einen Rest der Formel  $-X_nS$  steht, in welchem  
 $n = 0, 1, 2$  oder  $3$  ist,  
 35  $X$  für gleiche oder verschiedene Reste natürlich vorkommender neutraler oder basischer L-Aminosäuren und/oder der diesen entsprechenden D-Aminosäuren steht und

- S OH oder eine physiologisch verträgliche, die Carboxy-  
gruppe blockierende Gruppe bedeutet, die falls  
n=0 ist, einen positiv geladenen oder protonierbaren  
basischen Rest trägt oder, falls  $n > 0$  ist, einen  
5 solchen Rest tragen kann und worin der C-Terminus  
-X-S auch für den Rest einer zum entsprechenden Alkohol  
reduzierten Aminosäure oder, im Falle  $n=2$  oder 3, für  
den Homoserinlacton-Rest stehen kann.
- 10 3. Insulin-Derivat der Formel I, in welcher
- $R^{30}$  für den Rest einer neutralen, genetisch kodierbaren  
L-Aminosäure steht,
- a)  $R^1$  H bedeutet und
- 15  $R^{31}$  a 1) eine physiologisch verträgliche, die Carboxy-  
gruppe blockierende Gruppe  $S^B$ , die einen posi-  
tiv geladenen oder protonierbaren basischen Rest  
trägt, bedeutet,
- a 2.1) für  $X^N-S^B$  steht, worin  $X^N$   
20 den Rest einer natürlich vorkommenden neutralen  
L-Aminosäure oder deren D-Form bedeutet,
- a 2.2) für  $X^B-S$  steht, worin  $X^B$  den Rest einer  
natürlich vorkommenden basischen L-Aminosäure  
oder deren D-Form und S OH oder eine die Carboxy-  
25 gruppe blockierende, gegebenenfalls einen  
positiv geladenen oder protonierbaren basischen  
Rest tragende Gruppe bedeuten,
- a 2.3) für den Rest Y einer zum entsprechenden Alkohol  
reduzierten basischen Aminosäure  $X^B$  steht,
- 30 a 3.1) für  $-X_n-S$  steht, worin  $n=2$  oder 3 ist, X die  
Reste  $X^N$  und/oder  $X^B$  bedeutet und S, falls  
alle Reste  $X=X^N$  sind, nur  $S^B$  bedeuten kann,
- a 3.2) für  $-X_n-Y$  steht, worin  $n=1$  oder 2 ist,
- 35 a 3.3) für  $-X^B-Z$ ,  $-X^B-X^N-Z$ ,  $-X^N-X^B-Z$  oder  
 $-X^B-X^B-Z$  steht, worin  $Z=Y$  ist oder den  
Homoserinlacton-Rest bedeutet oder

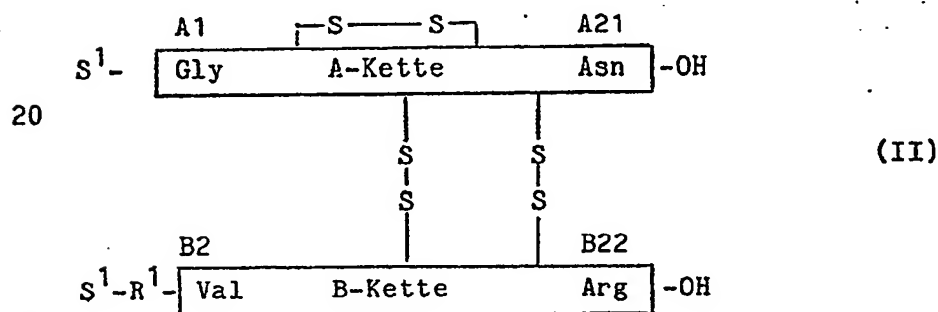
- b)  $R^1$  H-Phe bedeutet und  
 $R^{31}$
- b 1) wie unter a 1) definiert ist,
  - b 2.1) wie unter a 2.1) definiert ist,
  - b 2.2) Lys-OH, D-Lys-OH, D-Arg-OH, Hyl-OH, D-Hyl-OH,  
5 Orn-OH, D-Orn-OH, Cit-OH, D-Cit-OH, His-OH oder  
D-His-OH bedeutet,
  - b 2.3) für  $X^B-S'$  steht, worin  $S'$  die Bedeutung von S  
mit Ausnahme der von OH hat,
  - b 2.4) wie unter a 2.3) definiert ist,
  - 10 b 3.1) für  $X-X'-OH$  oder  $-X'-X-OH$  steht, worin  $X'$  wie  
unter b 2.2) definiert ist,
  - b 3.2) für  $X_2-S'$  steht,
  - b 3.3) wie unter a 3.1) definiert ist, wobei  $n=3$  ist,
  - 15 b 3.4) wie unter a 3.2) oder a 3.3) definiert ist,  
oder dessen physiologisch verträglichen Salze.
4. Insulin-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch  
gekennzeichnet, daß  $R^1$  für H-Phe steht.  
20
5. Insulin-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 4,  
dadurch gekennzeichnet, daß  $R^{30}$  für Ala, Thr oder Ser  
steht.
- 25 6. Insulin-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 5,  
dadurch gekennzeichnet, daß die A-Kette und die Kette  
(B2-29) die Sequenz des Humaninsulins aufweisen.
7. Insulin-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch  
30 gekennzeichnet, daß die Aminosäurereste  $X$ ,  $X^N$  und  $X^B$   
sowie die Reste Y und Z in der L-Konfiguration vorliegen.
8. Insulin-Derivat nach einem der Ansprüche 2 bis 7, dadurch  
gekennzeichnet, daß S bzw.  $S'$  für  $(C_1 \text{ bis } C_6)$ -Alkoxy,  
35  $(C_3 \text{ bis } C_6)$ -Cycloalkyloxy,  $NH_2$ ,  $(C_1 \text{ bis } C_6)$ -  
Alkylamino, Di- $(C_1 \text{ bis } C_6)$ -alkylamino,

Amino-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>)-alkoxy, (C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>)-  
Alkylamino-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>)-alkoxy, Di-(C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>)-  
alkylamino-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>)-alkoxy, Tri-(C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>)-  
ammonio-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>)-alkoxy, Amino-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>)-  
5 alkylamino, [ (C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>)-Alkylamino ]-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>)-  
alkylamino, [ Di-(C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>)-alkylamino ]-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>)-  
alkylamino oder [ Tri-(C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>)-alkylammonio ]-(C<sub>2</sub>  
bis C<sub>6</sub>)-alkylamino steht und S<sup>B</sup> eine der acht letztge-  
nannten Bedeutungen hat.

10

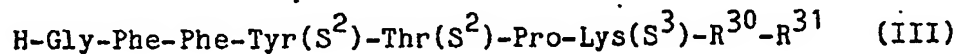
9. Verfahren zur Herstellung eines Insulin-Derivats der  
Formel I gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch  
gekennzeichnet, daß man

15 a) ein Des-Octapeptid (B 23-30)-Insulin der Formel II,



25

in der R<sup>1</sup> Phe oder eine Bindung und S<sup>1</sup> eine protonen-  
solvolytisch oder durch β-Eliminierung abspaltbare Amino-  
schutzgruppe wie den tert-Butyloxycarbonyl-(Boc), den  
tert-Amyloxycarbonyl-(Aoc) oder den Methylsulfonylethyloxy-  
30 carbonyl-(Msc)-Rest bedeuten, kondensiert mit einem Peptid  
der Formel III



35 in welcher R<sup>30</sup> und R<sup>31</sup> die in den Ansprüchen 1 und 2  
definierten Bedeutungen haben, S<sup>2</sup> für Wasserstoff, Bzl  
oder Bu<sup>t</sup> und S<sup>3</sup> für eine Urethanschutzgruppe, wie Boc,

- Moc, Fmoc oder Z stehen, wobei in den Resten  $R^{30}$  und  $R^{31}$  vorhandene freie COOH-, OH-, SH-,  $NH_2$ -, Guanidino- und/oder Imidazol-Gruppen, falls erforderlich, in an sich bekannter Weise geschützt vorliegen und gegebenenfalls vorhandene Schutzgruppen in an sich bekannter Weise abspaltet,
- b) ein Des-B30-Insulin der Formel I, in welcher  $R^1$  für H oder H-Phe und der C-Terminus  $R^{30}$ - $R^{31}$  zusammen für OH stehen, in Gegenwart von Trypsin oder einer trypsinähnlichen Endopeptidase umgesetzt mit einer Verbindung der Formel IV



- in der  $R^{30}$  und  $R^{31}$  die in den Ansprüchen 1 bis 3 definierten Bedeutungen haben und worin vorhandene freie COOH-, OH-, SH-,  $\omega$ - $NH_2$ -, Guanidino- und/oder Imidazol-Funktionen, falls erforderlich, in an sich bekannter Weise geschützt vorliegen und anschließend gegebenenfalls vorhandene Schutzgruppen in an sich bekannter Weise abspaltet, oder
- c) zur Herstellung eines Insulin-Derivates gemäß Anspruch 7 ein Proinsulin, Proinsulinderivat, Präproinsulinderivat oder ein Intermediat dieser Verbindungen chemisch und/oder enzymatisch spaltet, und die nach a)-c) erhaltenen Verbindungen gegebenenfalls in ihre physiologisch verträglichen Salze überführt.
10. Insulin-Derivat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Verwendung als Heilmittel.
11. Arzneimittel enthaltend ein Insulin-Derivat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8.
12. Arzneimittel aus einem pharmazeutisch unbedenklichen Träger und einem Wirkstoff, dadurch gekennzeichnet, daß es als Wirkstoff ein Insulin-Derivat mit einem isoelektrischen Punkt zwischen 5,8 und 8,5 und der Formel I, in welcher



- R<sup>1</sup> H oder H-Phe bedeutet,  
R<sup>30</sup> für den Rest einer neutralen, genetisch kodierbaren L-Aminosäure steht und  
R<sup>31</sup> für eine physiologisch unbedenkliche organische Gruppe basischen Charakters mit bis zu 50 C-Atomen steht, an deren Aufbau 0 bis 3  $\alpha$ -Aminosäuren beteiligt sind und deren gegebenenfalls vorhandene endständige Carboxyfunktion frei, als Esterfunktion, als Amidfunktion, als Lacton oder zu CH<sub>2</sub>OH reduziert vorliegen kann, oder eines seiner physiologisch verträglichen Salze enthält.
13. Mittel gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß es als Wirkstoff Insulin-B31-Arg-OH oder Insulin-B31-Arg-Arg-OH enthält.
14. Mittel gemäß Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß dieses einen pH-Wert zwischen 2,5 und 8,5 aufweist, ein geeignetes Isotonie-Mittel und ein geeignetes Konservierungsmittel enthält und daß das Insulin-Derivat der Formel I gelöst und/oder in Suspension vorliegt.
15. Mittel gemäß einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß dieses einen geeigneten Puffer enthält und der pH-Wert zwischen 4,0 und 8,5 liegt.
16. Mittel gemäß einem der Ansprüche 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß dieses zwischen 0 und 100  $\mu$ g Zink/100 I.U. enthält.
17. Mittel gemäß einem der Ansprüche 12 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid der Formel I in Form eines Alkalisalzes oder des Ammoniumsalzes vorliegt.
18. Mittel gemäß einem der Ansprüche 12 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß ein beliebiger Anteil eines oder

mehrerer Insulin-Derivate der Formel I oder ein Insulin-Derivat der Formel I in einer Mischung weiterer dieser Insulin-Derivate unabhängig voneinander jeweils in gelöster, amorpher und/oder kristalliner Form vorliegen.

5

19. Mittel gemäß einem der Ansprüche 12 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß dieses eine geeignete Menge eines Hilfsmittels mit verzögernder Wirkung enthält.

- 10 20. Mittel gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß dieses Verzögerungsprinzip in Kombination mit dem gesamten Wirkstoffanteil oder mit Teilen davon oder einem oder mehreren Insulin-Derivaten der Formel I in einer Mischung angewandt wird.

15

21. Mittel gemäß einem der Ansprüche 12 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß es verschiedene Insulin-Derivate der Formel I in Kombination mit mehreren verschiedenen verzögernd wirkenden Hilfstoffen enthält.

20

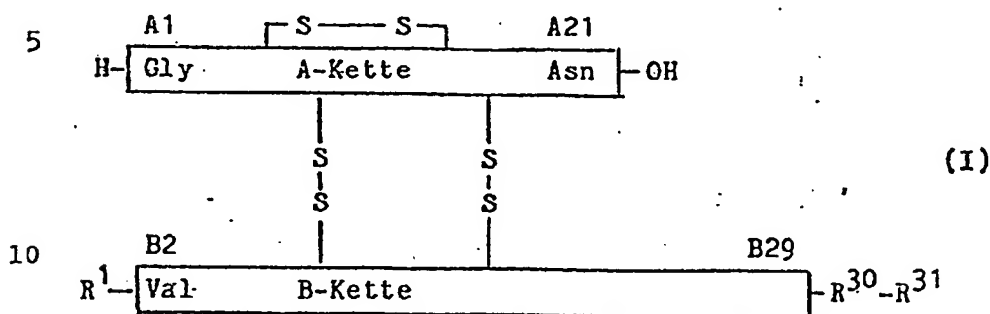
22. Verfahren zur Herstellung eines Mittels gemäß Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Insulin-Derivat der Formel I in eine geeignete Darreichungsform bringt.

25

23. Verwendung eines Insulin-Derivats gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 oder eines Mittels gemäß einem der Ansprüche 11 bis 21 zur Behandlung des Diabetes mellitus.

Patentansprüche für den Vertragsstaat AT: HOE 83/F 141

1. Verfahren zur Herstellung eines Insulin-Derivats der Formel I



in welcher

15  $R^1$  H oder H-Phe bedeutet,

$R^{30}$  für den Rest einer neutralen, genetisch kodierbaren L-Aminosäure steht und

$R^{31}$  für eine physiologisch unbedenkliche organische Gruppe

20 basischen Charakters mit bis zu 50 C-Atomen steht, an deren Aufbau 0 bis 3  $\alpha$ -Aminosäuren beteiligt sind und deren gegebenenfalls vorhandene endständige Carboxy-

funktion frei, als Esterfunktion, als Amidfunktion,

als Lacton oder zu  $\text{CH}_2\text{OH}$  reduziert vorliegen kann,

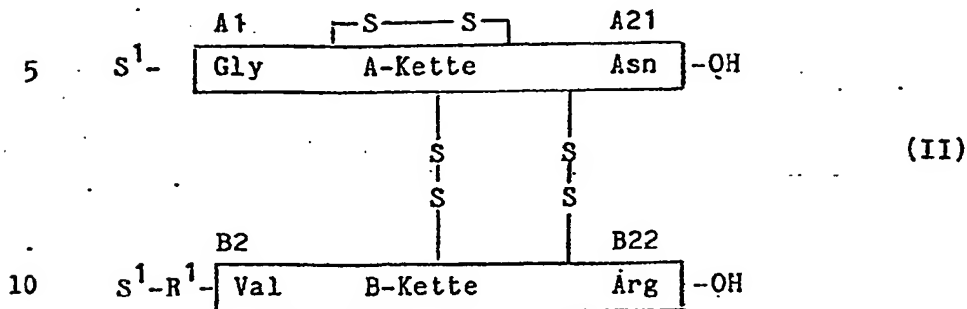
wobei, falls  $R^1$  für H-Phe steht, der C-Terminus  $-\text{R}^{30} \text{-R}^{31}$

25 nicht  $-\text{Thr}(\text{Arg})_m\text{-OH}$ ,  $-\text{Ala}(\text{Arg})_m\text{-OH}$  oder  $-\text{Ser}(\text{Arg})_m\text{-OH}$

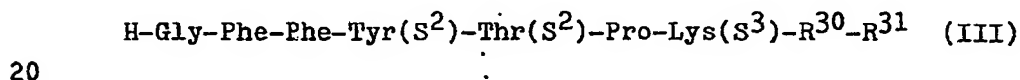
mit  $m = 1$  oder 2 bedeuten kann, mit einem isoelektrischen Punkt zwischen 5,8 und 8,5 oder dessen physiologisch ver-

träglichen Salzen, dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) ein Des-Octapeptid (B 23-30)-Insulin der Formel II,  
Insulin-Derivat der Formel I,



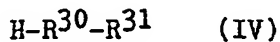
in der R<sup>1</sup> Phe oder eine Bindung und S<sup>1</sup> eine protonen-  
solvolytisch oder durch  $\beta$ -Eliminierung abspaltbare Ami-  
noschutzgruppe wie den tert-Butyloxycarbonyl-(Boc), den  
15     tert-Amyloxycarbonyl-(Aoc) oder den Methylsulfonyl-  
ethyloxycarbonyl-(Msc)-Rest bedeuten, kondensiert mit  
einem Peptid der Formel III



in welcher R<sup>30</sup> oder R<sup>31</sup> die obigen Bedeutungen haben,  
S<sup>2</sup> für Wasserstoff, Bzl oder Bu<sup>t</sup> und S<sup>3</sup> für eine Ure-  
thanschutzgruppe, wie Boc, Moc, Fmoc oder Z stehen, wo-  
bei in den Resten R<sup>30</sup> und R<sup>31</sup> vorhandene freie COOH-,  
25     OH-, SH-, NH<sub>2</sub>-, Guanidino und/oder Imidazol-Gruppen,  
falls erforderlich, in an sich bekannter Weise ge-  
schützt vorliegen und gegebenenfalls vorhandene Schutz-  
gruppen in an sich bekannter Weise abspaltet, oder

- 30     b) ein Des-B30-Insulin der Formel I, in welcher R<sup>1</sup> für H  
oder H-Phe und der C-Terminus R<sup>30</sup>-R<sup>31</sup> zusammen für OH  
stehen, in Gegenwart von Trypsin oder einer tryptinähn-  
lichen Endopeptidase umgesetzt mit einer Verbindung der  
Formel IV

35



in der  $R^{30}$  und  $R^{31}$  die in den Ansprüchen 1 bis 3 definierten Bedeutungen haben und worin vorhandene freie  $\text{COOH-}$ ,  $\text{OH-}$ ,  $\text{SH-}$ ,  $\omega\text{-NH}_2\text{-}$ , Guanidino- und/oder Imidazol-Funktionen, falls erforderlich, in an sich bekannter Weise geschützt vorliegen und anschließend gegebenenfalls vorhandene Schutzgruppen in an sich bekannter Weise abspaltet, und die nach a) oder b) erhaltenen Verbindungen gegebenenfalls in ihre physiologisch verträglichen Salze überführt.

10

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Insulin-Derivat der Formel I herstellt, in welcher

15

$R^{31}$  für einen Rest der Formel  $-\text{X}_n\text{S}$  steht, in welchem  $n = 0, 1, 2$  oder  $3$  ist,

$\text{X}$  für gleiche oder verschiedene Reste natürlich vorkommender neutraler oder basischer L-Aminosäuren und/oder der diesen entsprechenden D-Aminosäuren steht und

20

$\text{S}$   $\text{OH}$  oder eine physiologisch verträgliche, die Carboxygruppe blockierende Gruppe bedeutet, die falls  $n=0$  ist, einen positiv geladenen oder protonierbaren basischen Rest trägt oder, falls  $n>0$  ist, einen solchen Rest tragen kann und worin der C-Terminus

25

$-\text{X-S}$  auch für den Rest einer zum entsprechenden Alkohol reduzierten Aminosäure oder, im Falle  $n = 2$  oder  $3$ , für den Homoserinlacton-Rest stehen kann.

30

3. Verfahren zur Herstellung eines Insulin-Derivats der Formel I, in welcher

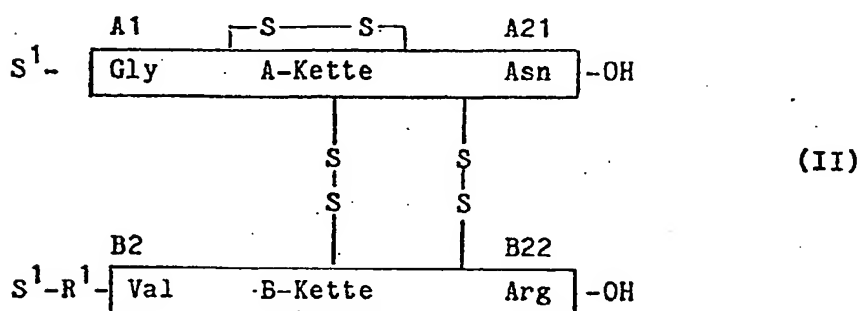
35

$R^{30}$  für den Rest einer neutralen, genetisch kodierbaren L-Aminosäure steht,

- a)  $R^1$  H bedeutet und
- $R^{31}$  a 1) eine physiologisch verträgliche, die Carboxy-  
gruppe blockierende Gruppe  $S^B$ , die einen posi-  
tiv geladenen oder protonierbaren basischen  
Rest trägt, bedeutet,
- 5 a 2.1) für  $X^N-S^B$  steht, worin  $X^N$   
den Rest einer natürlich vorkommenden neutralen  
L-Aminosäure oder deren D-Form bedeutet,
- a 2.2) für  $X^B-S$  steht, worin  $X^B$  den Rest einer natür-  
lich vorkommenden basischen L-Aminosäure oder  
10 deren D-Form und S OH oder eine die Carboxy-  
gruppe blockierende, gegebenenfalls einen posi-  
tiv geladenen oder protonierbaren basischen  
Rest tragende Gruppe bedeuten,
- 15 a 2.3) für den Rest Y einer entsprechenden Alkohol re-  
duzierten basischen Aminosäure  $X^B$  steht,
- a 3.1) für  $-X_n-S$  steht, worin  $n = 2$  oder  $3$  ist, X die  
Reste  $X^N$  und/oder  $X^B$  bedeutet und S, falls alle  
20 Reste  $X=N^N$  sind, nur  $S^B$  bedeuten kann,
- a 3.2) für  $-X_n-Y$  steht, worin  $n = 1$  oder  $2$  ist,
- a 3.3) für  $-X^B-Z$ ,  $-X^B-X^N-Z$ ,  $-S^N-S^B-Z$  oder  $-X^B-X^B-Z$   
steht, worin  $Z=Y$  ist oder den Homoserinlacton-  
Rest bedeutet oder
- 25 b)  $R^1$  H-Phe bedeutet und
- $R^{31}$  b 1) wie unter a 1) definiert ist,
- b 2) wie unter a 2.1) definiert ist,
- b 2.2) Lys-OH, D-Lys-OH, D-Arg-OH, Hyl-OH, D-Hyl-OH,  
30 Orn-OH, D-Orn-OH, Cit-OH, D-Cit-OH, His-OH oder  
D-His-OH bedeutet,
- b 2.3) für  $X^B-S'$  steht, worin  $S'$  die Bedeutung von S  
mit Ausnahme der von OH hat,
- 35 b 2.4) wie unter a 2.3) definiert ist,

- b 3.1) für  $X-X'-OH$  oder  $-X'-X-OH$  steht, worin  $X'$  wie unter b 2.2) definiert ist,  
 b 3.2) für  $X_2-S'$  steht,  
 b 3.3) wie unter a 3.1) definiert ist, wobei  $n = 3$  ist,  
 b 3.4) wie unter a 3.2) oder a 3.3) definiert ist, oder dessen physiologisch verträglichen Salzen, dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) ein Des-Octapeptid (B 23-30)-Insulin der Formel II,  
 Insulin-Derivat der Formel I,



in der  $R^1$  Phe oder eine Bindung und  $S^1$  eine protonen-solvolytisch oder durch  $\beta$ -Eliminierung abspaltbare Aminoschutzgruppe wie den tert-Butyloxycarbonyl-(Boc), den tert-Amyloxycarbonyl-(Aoc) oder den Methylsulfonyl-ethyloxycarbonyl-(Msc)-Rest bedeuten, kondensiert mit einem Peptid der Formel III, in welcher  $R^{30}$  oder  $R^{31}$  die obigen Bedeutungen haben,  $S^2$  für Wasserstoff, Bzl oder  $Bu^t$  und  $S^3$  für eine Urethanschutzgruppe, wie Boc, Moc, Fmoc oder Z stehen, wobei in den Resten  $R^{30}$  und  $R^{31}$  vorhandene freie  $COOH-$ ,  $OH-$ ,  $SH-$ ,  $NH_2-$ , Guanidino und/oder Imidazol-Gruppen, falls erforderlich, in an sich bekannter Weise geschützt vorliegen und gegebenenfalls vorhandene Schutzgruppen in an sich bekannter Weise abspaltet, oder

- b) ein Des-B30-Insulin der Formel I, in welcher  $R^1$  für H oder H-Phe und der C-Terminus  $R^{30}-R^{31}$  zusammen für OH stehen, in Gegenwart von Trypsin oder einer trypsinähnlichen Endopeptidase umgesetzt mit einer Verbindung der Formel IV, in der  $R^{30}$  und  $R^{31}$  die in den Ansprüchen 1 bis 3 definierten Bedeutungen haben und worin vorhandene freie  $\text{COOH-}$ ,  $\text{OH-}$ ,  $\text{SH-}$ ,  $\omega\text{-NH}_2\text{-}$ , Guanidino- und/oder Imidazol-Funktionen, falls erforderlich, in an sich bekannter Weise geschützt vorliegen und anschließend gegebenenfalls vorhandene Schutzgruppen in an sich bekannter Weise abspaltet, und die nach a) oder b) erhaltenen Verbindungen gegebenenfalls in ihre physiologisch verträglichen Salze überführt.
- 5
- 15 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Insulin-Derivat der Formel I herstellt, in der  $R^1$  für H-Phe steht.
- 20 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Insulin-Derivat der Formel I herstellt, in der  $R^{30}$  für Ala, Thr oder Ser steht.
- 25 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Insulin-Derivat der Formel I herstellt, in der die A-Kette und die Kette (B2-29) die Sequenz des Humaninsulins aufweisen.
- 30 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Insulin-Derivat der Formel I herstellt, in der die Aminosäurereste, X,  $X^N$  und  $X^B$  sowie die Reste Y und Z in der L-Konfiguration vorliegen.



8. Verfahren zur Herstellung eines Insulin-Derivats der Formel I, in der die Aminosäurereste, X, X<sup>N</sup>, X<sup>B</sup>, Y und Z definiert sind wie in Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Proinsulin, Proinsulinderivat, Präproinsulinderivat oder ein Intermediat dieser Verbindungen chemisch und/oder enzymatisch spaltet und gegebenenfalls in physiologisch verträgliche Salze überführt.
9. Insulin-Derivat nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß S bzw. S' für (C<sub>1</sub> bis C<sub>6</sub>)-Alkoxy, (C<sub>3</sub> bis C<sub>6</sub>)-Cycloalkyloxy, NH<sub>2</sub>, (C<sub>1</sub> bis C<sub>6</sub>)-Alkylamino, Di-(C<sub>1</sub> bis C<sub>6</sub>)-alkylamino, Amino-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>)-alkoxy, (C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>)-Alkylamino-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>)-alkoxy, Di-(C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>)-alkylamino-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>)-alkoxy, Tri-(C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>)-ammonio-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>)-alkoxy, Amino-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>)-alkylamino, [(C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>)-Alkylamino]-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>)-alkylamino, [Di-(C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>)-alkylamino]-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>)-alkylamino oder [Tri-(C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>)-alkylammonio]-(C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>)-alkylamino steht und S<sup>B</sup> eine der acht letztgenannten Bedeutungen hat.
10. Verfahren zur Herstellung eines Insulin-Derivats gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Verwendung als Heilmittel.
11. Verfahren zur Herstellung eines Insulin-Derivats gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Verwendung als Heilmittel bei der Behandlung des Diabetes mellitus.
12. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels aus einem pharmazeutisch unbedenklichen Träger und einem Insulin-Derivat mit einem isoelektrischen Punkt zwischen 5,8 und 8,5 und der Formel I, in welcher
  - R<sup>1</sup> H oder H-Phe bedeutet,
  - R<sup>30</sup> für den Rest einer neutralen, genetisch kodierbaren L-Aminosäure steht und

- R<sup>31</sup> für eine physiologisch unbedenkliche organische Gruppe basischen Charakters mit bis zu 50-C-Atomen steht, an deren Aufbau 0 bis 3  $\alpha$ -Aminosäuren beteiligt sind und deren gegebenenfalls vorhandene endständige Carboxyfunktion frei, als Esterfunktion, als Amidfunktion, als Lacton oder zu CH<sub>2</sub>OH reduziert vorliegen kann, oder eines seiner physiologisch verträglichen Salze als Wirkstoff, dadurch gekennzeichnet, daß man diese in eine geeignete Darreichungsform bringt.
13. Verfahren gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Mittel herstellt, das als Wirkstoff Insulin-B31-Arg-OH oder Insulin-B31-Arg-Arg-OH enthält.
14. Verfahren gemäß Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Mittel herstellt, welches einen pH-Wert zwischen 2,5 und 8,5 aufweist, ein geeignetes Isotonie-Mittel und ein geeignetes Konservierungsmittel enthält und worin Insulin-Derivat der Formel I gelöst und/oder in Suspension vorliegt.
15. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Mittel herstellt, welches einen geeigneten Puffer enthält und dessen pH-Wert zwischen 4,0 und 8,5 liegt.
16. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Mittel herstellt, welches zwischen 0 und 100  $\mu$ g Zink/100 I.U. enthält.
17. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 12 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Mittel herstellt, worin das Peptid der Formel I in Form eines Alkalisalzes oder des Ammoniumsalzes vorliegt.

18. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 12 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Mittel herstellt, worin ein beliebiger Anteil eines oder mehrerer Insulin-Derivate der Formel I oder ein Insulin-Derivat der Formel I in einer Mischung weiterer dieser Insulin-Derivate unabhängig voneinander jeweils in gelöster, amorpher und/oder kristalliner Form vorliegen.
19. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 12 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Mittel herstellt, welches eine geeignete Menge eines Hilfsmittels mit verzögernder Wirkung enthält.
20. Verfahren gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß dieses Verzögerungsprinzip in Kombination mit dem gesamten Wirkstoffanteil oder mit Teilen davon oder einem oder mehreren Insulin-Derivaten der Formel I in einer Mischung angewandt wird.
21. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 12 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß es verschiedene Insulin-Derivate der Formel I in Kombination mit mehreren verschiedenen verzögernd wirkenden Hilfsstoffen enthält.

0132770

Europäisches  
Patentamt

**EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT,**  
der nach Regel 45 des Europäischen Patent-  
übereinkommens für das weitere Verfahren als  
europäischer Recherchenbericht gilt

Nummer der Anmeldung

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			EP 84108442.9
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)
P, X	EP - A1 - 0 092 280 (AKZO N.V.) * Ansprüche 1-8; Seiten 1,5,6,8-10 *	1-12, 14,15, 17,18, 22,23	C 07 K 7/40 C 12 P 21/04 C 12 P 21/06 A 61 K 37/26
A	EP - A1 - 0 045 187 (DE FORENE DE BRYGGERIER A/S) * Anspruch 1; Seiten 6,7 *	1-3,5-9	
D, A	US - A - 4:029 642 (R. OBERMEIER) * Anspruch *	1-3,5-9	
P, A	EP - A1 - 0 089 007 (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT) * Anspruch 1; Seiten 3,4 *	1-3,5-12,22,23	
A	EP - A1 - 0 017 938 (SHIONOGI & CO. LTD.) * Ansprüche 1-3; Seiten 5-7,10,11 *	1-3,5-12,15,16,22,23	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 4)
			C 07 K 7/00 C 12 P 21/00 A 61 K 37/00
<b>UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE</b>			
<p>Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung den Vorschriften des Europäischen Patentübereinkommens so wenig, daß es nicht möglich ist, auf der Grundlage einiger Patentansprüche sinnvolle Ermittlungen über den Stand der Technik durchzuführen.</p> <p>Vollständig recherchierte Patentansprüche: 1-22 Unvollständig recherchierte Patentansprüche: -- Nicht recherchierte Patentansprüche: 23 Grund für die Beschränkung der Recherche: Methode zur Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers, Art. 52(4) EPÜ</p>			
Recherchenort <b>WIEN</b>		Abschlußdatum der Recherche <b>30-10-1984</b>	Prüfer <b>PETROUSEK</b>
<b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</b> X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze		E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	